



## 小鼠肺泡类器官培养试剂盒

货号：MN1006

### 产品描述

小鼠肺泡类器官培养基是一种可应用于组织来源的小鼠肺泡类器官建立和长期培养的无血清培养基。在细胞外基质存在的条件下，培养基所含的特有组分及丰富的细胞因子能促使小鼠肺泡细胞迅速生长并形成小鼠肺泡类器官。类器官形成过程平稳且迅速，同时保持较高的小鼠肺泡细胞特性和活力，为后续基于小鼠肺泡类器官研究提供支持，并助力小鼠肺泡基础研究的发展。

### 产品组分

产品名称	货号	规格	储存温度&保质期
小鼠肺泡类器官基础培养基 A	HC1001-A500	500 mL	4°C, 12 个月
小鼠肺泡类器官培养基添加物 B (50x)	HC1001-B10	10 mL	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月
小鼠肺泡类器官培养基添加物 C (250x)	HC1001-C1	1 mL×2	-20°C, 避免反复冻融, 12 个月

### 产品应用

使用无菌操作技术配制小鼠肺泡类器官完全培养基。以下是准备 50 mL 完全培养基操作流程，如所需量不同，可按比例调整用量。

1. 0-4°C 解冻小鼠肺泡类器官培养基添加物 B (50x) 以及小鼠肺泡类器官培养基添加物 C (250x)。

**注意：**1、解冻后，建议将类器官培养基添加物 B (50x)和类器官培养基添加物 C(250x) 分别分装后-20°C 保存取用，避免反复冻融。

2、分装时需待溶液完全融化，确认其澄清、透明、无不溶物（如有上述异常可将溶液置于室温/37°C 并轻轻吹打），充分混匀后分装。

3、每次使用前也应注意将溶液完全融化、充分混匀。

2. 将 1 mL 小鼠肺泡类器官培养基添加物 B (50x)和 200  $\mu$ L 小鼠肺泡类器官培养基添加物 C (250x)加至 48.8 mL 小鼠肺泡类器官基础培养基 A 中，充分混匀，配置成 50 mL 小鼠肺泡类器官完全培养基。

**注意：**配制后的小鼠肺泡类器官完全培养基可在 2-8°C 储存，建议在一周内使用。

3. 使用时可选择性在小鼠肺泡类器官完全培养基中加入真菌或者细菌抗生素。

## 小鼠肺泡类器官原代建立

1. 取样：将合理来源的小鼠处死后解剖，取出小鼠整肺置于组织保存液 (货号 BM1002)中 2-8°C 暂存，并在指定时间内在生物安全柜中剪取肺边缘 1 mm 左右的部分置于新的组织保存液 (货号 BM1002)中，进行类器官建立。

2. 清洗：去除组织保存液，用适量 PBS 清洗组织样本 2-3 次。

3. 组织消化：将组织样本转移至 15 mL 离心管中，加入 5-10 mL 组织消化液 (货号 BM1003)，然后用无菌的手术剪刀剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小碎片，置于 37°C，100rpm 恒温振荡培养箱中消化 20-40 min。

4. 过滤：在确认消化完成的组织悬液中加入胎牛血清至终浓度达 10% 后吹打混合均匀以终止消化，之后将悬液用 100  $\mu$ m 细胞过滤器过滤至全新的 15 mL 离心管中。

5. 红细胞裂解：将上述所得滤液以 300 g 离心力离心 3min 后弃上清，根据沉淀颜色观察是否需要裂红，若需要则加入 1mL 红细胞裂解液(货号 BM1008)，充分混匀，置于 2-8°C，1-3 min。

6. 清洗：将 5 中所得细胞悬液以 300 g 离心力离心 3 min 后弃上清，用 PBS 重悬细胞沉

淀并清洗 1-2 遍。

7. 细胞接种：完成清洗后将细胞悬液以 300 g 离心力离心 3 min 后弃上清，置于冰上预冷，加入适量类器官专用基质胶(货号 BM1001)重悬细胞沉淀并混匀（建议细胞量：1000-2000 个/ $\mu\text{L}$ ），按照每孔 30-40  $\mu\text{L}$  将细胞悬液点入 24 孔板中。将孔板置于 37°C、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中 15-30min，使基质胶凝固。待基质胶凝固完成，缓慢向每孔加入 500  $\mu\text{L}$  小鼠肺泡类器官完全培养基。

**注意：**勿将培养基直接添加到基质胶胶滴的顶部，避免会破坏已凝固结构。

8. 培养：将上述培养板置于 37°C、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中培养，每 3 天换液，观察并拍照记录。

**注意：**勿过度稀释基质胶（基质胶浓度应 $\geq$ 70%）。

## 小鼠肺泡类器官传代培养

9. 收集：使用经抗黏附润洗液 (货号 BM1006) 润洗的 1 mL 枪头小心刮取类器官，并将其转移至 1.5 mL EP 管中。随后将收集到的液体以 300 g 离心力离心 3 min 后弃上清。

**注意：**弃上清时请保留残留基质胶，避免带走未脱离基质胶的类器官。

10. 消化：在上述 9 中所得的沉淀中加入 0.4 mL 类器官传代消化液 (货号 BM1004)，用 1 mL 移液器上下吹打后，置于 37°C，5% $\text{CO}_2$  恒温培养箱静置消化 3-5 min。

11. 终止消化：在消化完成之后加入 0.8 mL 2-8°C 预冷的 PBS 终止消化，并上下吹打，以帮助类器官更好地解离。

12. 清洗：将上述 11 中所得液体以 300 g 离心力离心 3min 后弃上清。用 PBS 重悬清洗 1-2 次。

13. 细胞接种：完成清洗后将细胞悬液以 300 g 离心力离心 3 min 后弃上清，置于冰上预冷，加入适量类器官专用基质胶(货号 BM1001)重悬细胞沉淀并混匀（建议细胞量：

200-2000 个/ $\mu\text{L}$ ), 按照每孔 30-40  $\mu\text{L}$  将细胞悬液点入 24 孔板中。将孔板置于 37°C、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中 15-30 min, 使基质胶凝固。待基质胶凝固完成, 缓慢向每孔加入 500  $\mu\text{L}$  小鼠肺泡类器官完全培养基。

14. 培养: 将上述培养板置于 37°C 、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中培养, 每 3 天换液, 观察并拍照记录。

## 注意事项

1. 产品的分装、使用等操作需在无菌环境下进行。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 本产品仅供科研使用, 不得用于临床诊断或治疗。